

<원 저>

## 돈적리 균의 분리, 검출을 위한 수송배지의 비교

조세지<sup>1,2</sup> · 김종완<sup>1</sup> · 김하영<sup>1</sup> · 오상익<sup>1</sup> · 정소정<sup>1</sup> · 정지아<sup>1</sup> · 조아라<sup>1</sup> · 이명현<sup>1</sup> · 조호성<sup>2</sup> · 변재원<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>농림축산검역본부, <sup>2</sup>전북대학교 수의과대학

(접수: 2014년 8월 29일, 수정: 2015년 1월 5일, 게재승인: 2015년 1월 19일)

### Comparison of transport media for the isolation and detection of *Brachyspira hyodysenteriae*

Se-Ji Cho<sup>1,2</sup>, Jong Wan Kim<sup>1</sup>, Ha-Young Kim<sup>1</sup>, Sang-Ik Oh<sup>1</sup>, So Jeong Jeong<sup>1</sup>, Ji-A Jung<sup>1</sup>, Ara Cho<sup>1</sup>, Myoung-Heon Lee<sup>1</sup>, Ho-Seong Cho<sup>2</sup>, Jae-Won Byun<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Animal Disease Diagnostic Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Anyang 430-757, Korea

<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine and Bio-Safety Research Institute, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

(Received: August 29, 2014; Revised: January 5, 2015; Accepted: January 19, 2015)

**Abstract :** *Brachyspira (B.) hyodysenteriae* is a causative agent of swine dysentery that is responsible for death and economic losses in the pig industry. It is imperative that clinical samples be delivered fresh for accurate diagnosis. The viability and DNA detection of *B. hyodysenteriae* using lab-made (phosphate buffered saline and modified tryptic soy broth) or commercial transport media (C, D, and E) were compared by culturing and real-time PCR at 4°C or room temperature (RT), respectively. *B. hyodysenteriae* grown in D (Anaerobe Systems, USA) and E (Starplex Scientific, Canada) media was viable for 4 days at 4°C and RT. However, *B. hyodysenteriae* in A, B, and C (culture swab; BD Biosciences, USA) media were not recovered after 2 days at RT. Ct values for real-time PCR at 4°C and RT ranged from 27.2 ± 2.1 (C) to 29.6 ± 0.5 (B), and 28.0 ± 0.9 (E) to 30.2 ± 1.5 (B), respectively. Considering the field conditions, it is important that transport media is used for specimen isolation and PCR to obtain an accurate diagnosis of swine dysentery.

**Keywords :** *Brachyspira hyodysenteriae*, pigs, real-time PCR, transport media

## 서 론

*Brachyspira(B.) hyodysenteriae*는 그람 음성의 나선형 혐기성 세균으로 편모(periplasmic flagella)가 있어 운동성을 가지며 돼지에서 적리(dysentery)를 일으키는 원인체이다. 돈적리는 주로 육성돈과 비육돈에서 점액성 또는 혈액성 설사를 일으키는 질병으로 감염돈의 폐사 및 생산성 저하 등으로 국내는 물론 세계적으로 양돈산업에 큰 피해를 주고 있다 [8]. 돈적리 진단법으로는 점액성 또는 혈액성 설사 증상을 보이는 비육돈의 직장에서 멸균 면봉으로 표본을 채취하거나, 부검하여 결장에서 점막 또는 분변을 채취한 뒤 병리조직 검사, 세균 분리, 유전자검사를 하는 것이 일반적이다 [6]. 그러나 *B. hyodysenteriae*는 혐기성 균의 특성상 실험실로 운반되는 과정 중에 지속해서 산소에 노출될 위험이

있으며 이 과정에서 사멸할 가능성이 높다 [15]. 또한 *B. hyodysenteriae*는 온도의 변화에도 민감한 것으로 알려졌는데 10°C 이하에서 최장 48일까지 생존하지만 25°C에서는 생존율이 7일 이하로 현저하게 떨어진다 [3].

세균 분리와 진단에는 멸균 면봉에 특수배지 성분이나 식염수 등을 사용한 수송배지가 일반적으로 사용되고 있다. 이는 균의 생존율을 유지하면서 유전자검사를 할 수 있는 장점이 있으나, 혐기성 균의 보존성에 대한 결과는 매우 제한적이다 [10]. 따라서, 혐기성 세균을 성공적으로 분리하기 위해서는 적절한 시료 채취 후 안전한 수송배지를 사용하여 운반하는 것이 매우 중요하다 [9]. 국내에서는 돈적리의 진단을 위해 면봉이나 분변을 냉장 또는 상온 상태로 시료를 수송하고 있으며 혐기성 환경을 고려한 수송배지의 조사나 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 돈적리 균을

\*Corresponding author

Tel: +82-31-467-1751, Fax: +82-31-467-1868

E-mail: jaewon8911@korea.kr

다양한 수송배지를 이용하여 수송온도(4°C, 상온)에 따라 생존율을 비교하여 현장에 적용 가능한 최적의 수송배지 선별을 목적으로 하였다.

## 재료 및 방법

### 수송배지

총 5개(A, B, C, D 및 E)의 수송배지가 *B. hyodysenteriae*의 생존율을 측정하기 위하여 사용되었다. 각 수송배지 중 A(phosphate buffered saline [PBS], pH7.2)와 B[Tryptic soy broth, 10% fetal bovine serum, 0.1% L-cysteine, 0.01% agar(BD Biosciences, USA)]는 실험실에서 제조 후 screw cap tube에 9 mL씩 분주하여 사용하였으며, C(culture swab with Amies medium; BD Biosciences), D(anaerobic transport medium; Anaerobe Systems, USA), E(Anaerobic; Starplex Scientific, Canada)는 시판용 제품을 구매하여 사용하였다.

### 균주 및 배양

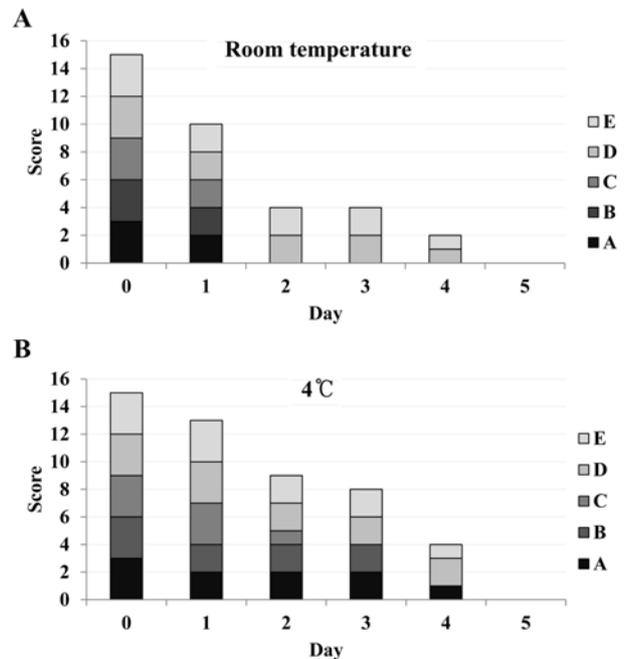
본 실험에서는 *B. hyodysenteriae* B78을 호주 Murdoch 대학 D. J. Hampson 교수로부터 분양받아 사용하였다. *B. hyodysenteriae*는 modified CVS agar(mCVS agar; trypticase soy agar, 6.25 µg/mL colistin, 6.25 µg/mL vancomycin, 200 µg/mL spectinomycin, 5% sheep blood and 50 mL/L feces extract)에서 접종 후 Anoxomat(Mart Microbiology, USA)을 사용하여 혐기 상태(N<sub>2</sub>: CO<sub>2</sub>: H<sub>2</sub> = 85%: 10%: 5%)를 유지하면서 37°C에서 5일간 배양하였다. 배양배지에서 *B. hyodysenteriae*에 의해 생긴 용혈 부위를 잘라 2 mL eppendorf tube에 넣고 PBS 1.5 mL를 첨가한 후 Tissuelyser (Qiagen, USA)로 균질화하였다. 이후 원심분리(5,000 × g) 한 상층액을 슬라이드글라스에 10 µL 떨어뜨린 후 위상차현미경(×400)으로 균의 운동성 및 생존여부를 관찰하였다. 또한 멸균 PBS를 이용하여 10진 희석액을 혈액배지에 배양 후 최초의 접종 균 수를 최종적으로 확인하였다.

### 분리율 조사

수송배지에 대한 생존율 조사는 4°C와 상온에서 각각 실시하였고, 5종(A, B, C, D 및 E)의 수송배지에 접종 균 액을 각각 1 mL씩 접종하였다. 5일 동안 멸균 면봉을 사용하여 균을 채취하고 mCVS 배지에 접종하여 상기와 같이 혐기 배양하였다. *B. hyodysenteriae*의 생존율은 Rubin 등 [14]의 방법에 따라 평가하였다. 간략하게 기술하면, 수송배

지에서 균을 채취한 면봉을 혈액배지에 희석 도말 한 후 멸균 loop를 이용하여 단일 집락 분리 시와 같이 연속적으로 도말 하였다. 배양 후 첫 번째 도말 부위에서 용혈이 관찰되면 score 1, 두 번째 부위는 score 2, 세 번째는 score 3 및 네 번째는 score 4로 수치화하여 균의 생존 여부를 평가하였다. 유전자검사를 위하여 배지에 접종한 면봉을 200 µL 멸균 PBS에 현탁 후 QIAamp DNA Mini Kit(Qiagen)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

수송배지 내 보존 기간별 돈적리의 유전자를 확인하기 위해서 *nox* gene을 이용한 real-time PCR법을 사용하였다. 시험에 사용한 primer 및 probe는 Table 1에 나타내었다. 반응액 조성은 총 20 µL에 10 µL 2× ExTaq(Takara Bio, Japan), 2 µM primer, 1 µM probe 및 2 µL template를 첨가하였으며, real-time PCR(Corbett Research, Australia) 기기를 이용하여 95°C에서 2분간 1회 처리 후 95°C에서 5초, 55°C에서 15초 및 72°C에서 5초 주기로 40회 반복하였다. 양성대조로 *B. hyodysenteriae* B78을 사용하였으며, 음성대조로는 멸균증류수를 사용하였다. 결과는 C<sub>T</sub> 값 40 이하에서



**Fig 1.** Survival of *Brachyspira* (*B.*) *hyodysenteriae* in the transport media at 4°C and room temperature for 5 days. (A) *B. hyodysenteriae* was not isolated except D and E in 2 days. (B) *B. hyodysenteriae* was recovered at 4°C in 3 days in A, B, D and E media.

**Table 1.** Oligonucleotide primers and probe used in this study

	DNA nucleotide sequence (5'-3')	Position*
B_hyo-F	ACTGGTCTTGGCCTGIAACTC	557-578
B_hyo-R	GTCCTTGCTGATAAAGCTTAGAGAA	704-720
probe	FAM-TCCTATCGAAGGCTTAAACAAGAAGGAAC-BHQ2	557-608

\*Genome position according to GenBank accession no. U19610.

**Table 2.** Real-time PCR for *B. hyodysenteriae* in the transport media at 4°C and room temperature (RT)

Temperature	Day	Transport media				
		A	B	C	D	E
4°C	0	30	30	26	26	25
	1	28	30	27	28	28
	2	28	30	24	28	28
	3	28	29	27	27	27
	4	29	30	29	27	27
	5	30	29	30	27	28
Mean ± SD		28.8 ± 1.0	29.6 ± 0.5	27.2 ± 2.1	27.2 ± 0.8	27.2 ± 1.2
RT	0	30	29	29	27	29
	1	29	28	28	28	29
	2	28	30	27	27	27
	3	28	32	29	28	28
	4	29	31	26	28	28
	5	29	31	30	30	27
Mean ± SD		28.8 ± 0.8	30.2 ± 1.5	28.2 ± 1.5	28.0 ± 1.1	28.0 ± 0.9

SD: standard deviation.

증폭되는 시료만을 양성으로 판정하였다 [4].

### 결 과

수송배지별로 각각 냉장(4°C) 및 상온에서 처리한 후 5일 동안 *B. hyodysenteriae*의 생존율을 조사하였다(Fig. 1). 시험에 사용된 접종 균 액의 균 수는  $3 \times 10^6$ /mL이었으며, 이는 score 3에 해당하였다. 온도에 따른 수송배지에서의 균 생존율을 비교한 결과 상온보다는 냉장에서 균의 보존성이 높게 나타났다. 상온(Fig. 1A)에서 돈적리 균은 배양 1일째 수송배지 모두에서 score 2를 나타내었으나 2일째에는 D와 E를 제외한 수송배지에서는 모두 검출되지 않았다. 4일째에는 수송배지 D와 E 모두 score 1에서만 균의 생존을 확인할 수 있었다. 냉장보관(4°C, Fig. 1B)에서는 수송배지 C를 제외한 모든 수송배지에서 3일까지 score 2를 유지하였다.

수송배지를 냉장과 상온에서 5일간 보관한 후 실시한 유전자검사 결과는 Table 2에 나타내었다. 수송배지별로 상온과 냉장에서 시험 시작일(0일)과 5일 차 간의 유전자검사 결과는  $C_T$  값이 냉장에서는  $27.2 \pm 2.1$ 에서  $29.6 \pm 0.5$ 까지 그리고 상온에서는  $28.0 \pm 0.9$ 에서  $30.2 \pm 1.5$ 까지로 큰 차이는 없었으나, 수송배지 C에서는 냉장과 상온 처리 시  $C_T$  값이  $27.2 \pm 2.1$ 과  $28.2 \pm 1.5$ 로 다른 수송배지에 비해 표준편차가 큰 것으로 확인되었다.

### 고 찰

돈적리를 진단하기 위해서는 검사 시료에서의 원인체 분리가 매우 중요하다. 돈적리 균은 산소를 싫어하는 혐기성 세균이기 때문에 균을 분리하기 위한 수송과정에서 사멸을

최소화하여야 한다. 이를 위하여 PBS 또는 10% charcoal 배지, 면봉과 fluid가 혼합된 상용배지 등 다양한 수송배지의 사용을 권장하고 있다 [1]. 따라서 본 연구에서는 효율적인 돈적리 균 분리 및 검출을 위해 시판되는 수송배지를 선별하여 수송 조건에 따른 돈적리 균 생존율 조사를 목적으로 본 시험을 수행하였다.

본 연구 결과 냉장(4°C) 균이 상온처리 균보다 생존율이 높게 나타났다. 냉장에서는 C 배지를 제외한 수송배지에서 3일 이상 생존이 가능하였으나, 상온에서는 D 및 E를 제외한 수송배지에서 2일째부터 균 분리가 되지 않았다. 즉 수송배지를 사용할 때에도 냉장 수송이 균의 생존력을 높이는 것으로 확인되었다. 이 결과는 다른 연구자의 결과와도 일치하였다. Barcellos 등 [5]은 돈적리 균은 배지 상태에서 냉장(4°C) 보관 시 7일까지 생존할 수 있으나, 37°C에서는 5일 이내에 사멸하며 분변과 혼합되었을 경우 37°C에서는 1일 이내로 생존율이 감소한다고 보고하였다. Chia와 Taylor [4]도 10°C 이하에서는 돈적리 균의 생존이 높아 48일까지, 25°C에서는 7일까지 생존하였다고 보고하였다. 또한 건조한 환경이나 소독제 사용은 돈적리 균을 급격히 사멸시킨다고 하였다.

본 연구 결과에서 기존 연구 결과보다 생존율이 낮게 나타나는 것은 대부분의 연구자가 실험 시 돈적리 균의 농도를  $10^{8-9}$  CFU/mL로 사용하였으나, 본 연구에서는  $10^6$  CFU/mL를 사용하였기 때문으로 추정된다. 이처럼 낮은 농도를 사용한 것은 돈적리가 동물실험에서 최소 분변 그람 당  $10^{5-6}$  CFU로도 감염력이 충분하다고 보고한 데 기인하였다 [12]. 즉 낮은 농도( $10^{5-6}$  CFU/g of feces)로 감염된 자돈에서도 수송배지를 통해 3일 이내에 실험실로 운반할 경우 균 분리가 가능할 것으로 생각된다.

국내에서는 신속한 진단을 위하여 균 분리보다 분변을 이용한 유전자검사법이 일반적으로 사용되고 있다 [16, 17]. 본 연구에서는 보존 기간별 유전자검사로 5일 동안 냉장과 상온에서 검사를 시행한 결과 유전자 변화는 거의 없었으나, 일반 분변 검사용으로 사용하는 수송배지 C는 냉장과 상온에서 유전자 검출 시 표준편차가 크고, 배지를 이용한 생존율에서도 상온에서는 2일 이후 사멸하기 때문에 돈적리의 수송배지로는 적합하지 않은 것으로 확인되었다. 일반적으로 유전자진단법은 원인체가 배양되지 않아도 시료에 남아 있는 유전자를 확인함으로써 돈적리 진단이 가능하여서 장 조직이나 분변에 적용하고 있다. 그러나 분변은 뮤신, 배지 성분 등과 같은 억제인과 DNAse 또는 부패과정에서 DNA의 자가분해 등으로 인해 유전자진단법의 민감도가 낮게 나타난다. Gibb와 Wong [7], Patterson 등 [13]은 균 분리 시 양성을 보인 81개체 중 71개체가 PCR에서는 음성으로 확인되었으며, 이는 유전자검사법이 임상 증상을 보이는 단계의 시료에서는 빠르고 효과적인 진단 방법이지만 하나, 수송배지나 분변에서는 PCR 반응이 낮게 나타나므로 준 임상적 단계의 시료에서는 균 분리가 더 효과적인 진단 방법이라고 하였다. 또한, Boye 등 [2]은 10°C에서 유전자검사법을 시행할 때 돈적리 균이 분변에서는 최장 112일, 분변과 혼합된 토양에서는 78일까지 검출이 가능한 것으로 보고하였다. 실시간 유전자 검사 결과 온도 간 Ct 값의 차이가 평균 1 정도로 거의 유사하게 측정된 것은 DNA의 분해가 건조한 환경에서는 130°C, 수분이 있는 환경에서는 90°C 정도에서부터 시작되기 때문이라고 생각한다 [11].

본 연구에서는 돈적리 균의 분리와 돈적리를 진단하기 위해 *B. hyodysenteriae*를 수송배지에 첨가하여 생존율과 유전자 검출률을 조사하고, 그 결과를 통해 돈적리 균의 배양과 진단 시에는 수송배지의 종류와 보존 방법이 중요함을 확인하였다.

## 감사의 글

이 논문은 농림축산식품부 농림축산검역기술개발과제(B-1543069-2014-15-03) 수행으로 이루어졌습니다.

## References

1. Achacha M, Messier S. Comparison of six different culture media for isolation of *Treponema hyodysenteriae*. J Clin Microbiol 1992, **30**, 249-251.
2. de Barcellos DESN, Mathiesen M, Duhamel G. Survival of pathogenic intestinal spirochetes kept in pure cultures and in pig feces held at four different temperatures. Acta Sci Vet 2002, **30**, 151-157.
3. Boye M, Baloda SB, Leser TD, Møller K. Survival of *Brachyspira hyodysenteriae* and *B. pilosicoli* in terrestrial microcosms. Vet Microbiol 2001, **81**, 33-40.
4. Chia SP, Taylor DJ. Factors affecting the survival of *Treponema hyodysenteriae* in dysenteric pig faeces. Vet Rec 1978, **103**, 68-70.
5. Cocolin L, Rantsiou K. Quantitative polymerase chain reaction in food microbiology. In: Filion M (ed.). Quantitative Real-time PCR in Applied Microbiology. pp. 149-160. Caister Academic Press, Norfolk, 2012.
6. Duhamel GE, Bernard RJ, Mathiesen MR, Eskridge KM. Comparison of six commercially available transport media for maintenance of *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. J Vet Diagn Invest 1992, **4**, 285-292.
7. Gibb AP, Wong S. Inhibition of PCR by agar from bacteriological transport media. J Clin Microbiol 1998, **36**, 275-276.
8. Hampson DJ. Brachyspiral colitis. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW (ed.). Diseases of swine. 10th ed. pp. 680-689. Wiley-Blackwell, Chichester, 2012.
9. Hampson DJ, Atyeo RF, Combs BG. Swine dysentery. In: Hampson DJ, Stanton TB (eds.). Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans. pp. 680-689. CAB international, Wallingford, 1997.
10. Hindiye M, Acevedo V, Carroll KC. Comparison of three transport systems (Starplex StarSwab II, the new Copan Vi-Pak Amies Agar Gel collection and transport swabs, and BBL Port-A-Cul) for maintenance of anaerobic and fastidious aerobic organisms. J Clin Microbiol 2001, **39**, 377-380.
11. Karni M, Zidon D, Polak P, Zalevsky Z, Shefi O. Thermal degradation of DNA. DNA Cell Biol 2013, **32**, 298-301.
12. Kinyon JM, Harris DL, Glock RD. Enteropathogenicity of various isolates of *Treponema hyodysenteriae*. Infect Immun 1977, **15**, 638-646.
13. Patterson AH, Rubin JE, Fernando C, Costa MO, Harding JCS, Hill JE. Fecal shedding of *Brachyspira* spp. on a farrow-to-finish swine farm with a clinical history of "*Brachyspira hampsonii*"-associated colitis. BMC Vet Res 2013, **9**, 137.
14. Rubin JE, Costa MO, Hill JE, Kittrell HE, Fernando C, Huang Y, O'Connor B, Harding JCS. Reproduction of mucohaemorrhagic diarrhea and colitis indistinguishable from swine dysentery following experimental inoculation with "*Brachyspira hampsonii*" strain 30446. PLoS One 2013, **8**, e57146.
15. Stanton TB, Rosey EL, Kennedy MJ, Jensen NS, Bosworth BT. Isolation, oxygen sensitivity, and virulence of NADH oxidase mutants of the anaerobic spirochete *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*, etiologic agent of swine dysentery. Appl Environ Microbiol 1999, **65**, 5028-5034.
16. Suh DK, Do YJ, Ha JS, Lee KH, Cho YJ, Song DJ, Lee CS, Bae YC, Choi WP, Lee KW, Song JC. Prevalence of *Brachyspira hyodysenteriae* on selected swine farms in Gyeongbuk province by PCR. Korean J Vet Serv 2001, **24**, 331-334.
17. Suh DK, Do YJ, Ha JS, Lee KH, Song DJ, Lee CS, Bae YC, Jung SC, Choi WP, Lee KW, Song JC. Rapid detection of *Brachyspira hyodysenteriae* in swine intestinal specimens by PCR. Korean J Vet Serv 2001, **24**, 335-341.